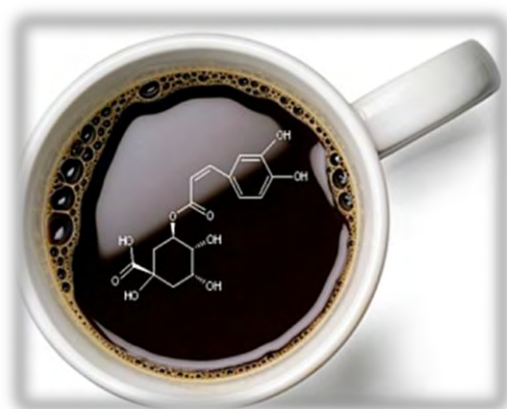




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε μυοβλάστες
ποντικού.

Effects of coffee extracts in oxidative stress markers on mouse myoblasts.



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κομιώτης: Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Κουρέτα. Επομένως, θα ήθελα να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την βοήθεια του, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για την καθοριστική βοήθεια του και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Περιεχόμενα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή.....	2
Ευχαριστίες	3
Περίληψη.....	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	8
1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	9
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	10
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορλίωση	10
1.4.2 Ουδτερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”	11
1.4.3 Μετατροπή της ζανθίνης σε ουρικό οξύ.....	12
1.4.4 Κυτόχρωμα P450	12
1.4.5 Αυτοοξείδωση μορίων.....	13
1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	13
1.6 Βιολογική δράση των ROS.....	13
1.6.1 Θετικές επιδράσεις	13
1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις.....	14
1.7 Οξειδωτικό στρες.....	16
1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	18
1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά	18
1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά	20
1.9 Πολυφαινόλες	20
1.9.1 Φυσικές ιδιότητες.....	21
1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών	21
1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	23
1.10 Καφές	25
1.10.1 Γενικά.....	25
1.10.2 Χημική σύσταση.....	25
2. Σκοπός	28

3. Υλικά και μέθοδοι	29
3.1 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ	29
3.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς C2C12.....	30
3.3 Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος.....	30
3.4 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	30
3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB)	31
3.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS	32
3.7 Στατιστική ανάλυση	34
4. Αποτελέσματα	35
5. Συζήτηση.....	42
6. Βιβλιογραφία.....	47

Περίληψη

Ο καφές είναι ένα δημοφιλές ρόφημα ανά τον κόσμο λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του, όπως η γεύση και το άρωμα. Το ρόφημα προέρχεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea* και σαν φυτικό προϊόν περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών όπως η καφεΐνη, οι πολυφαινόλες και άλλα. Οι κόκκοι του φυτού *Coffea* υφίστανται επεξεργασία και καβούρδισμα πριν τη χρήση για την παραγωγή του ροφήματος, γεγονός που είναι πιθανόν να οδηγήσει σε αλλαγή των ιδιοτήτων των βιοδραστικών συστατικών. Επομένως, ο καφές έχει στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω του και ως αποτέλεσμα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση των ιδιοτήτων του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αλλά εφόσον δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό δράσης, δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθούν στοχευμένες μελέτες. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν εννέα δείγματα καφέ εκ των οποίων τρεις πράσινοι και έξι αντίστοιχοι καβουρδισμένοι. Αρχικά ετοιμάστηκαν εκχυλίσματα για το κάθε δείγμα και στη συνέχεια χορηγήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις τους σε κυτταρική σειρά μυοβλαστών για να διαπιστωθεί η επίδραση που έχουν σε ορισμένους δείκτες οξειδωτικού στρες (οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα καφέ οδήγησαν σε μείωση της παρατηρούμενης οξείδωσης στις περισσότερες περιπτώσεις, χωρίς όμως να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δυο τεχνικών, ενώ το καβούρδισμα και η αποκαφεϊνοποίηση δεν επηρέασαν στατιστικώς σημαντικά την δραστητικότητα των εκχυλισμάτων. Αναλυτικότερα, στα καρβονύλια τα εκχύλισμα με την ισχυρότερη επίδραση ήταν το καβουρδισμένο *Robusta* με μείωση 51,5% ενώ στα TBARS ισχυρότερη επίδραση είχε το πιο καβουρδισμένο εκχύλισμα Brazil (Roasted 7 min) με παρατηρούμενη μείωση 36,9%.

Abstract

Coffee is a popular beverage around the world due to its organoleptic properties such as flavor and aroma. It is a brewed drink prepared from roasted coffee beans, which deriving from the *Coffea* spp plant. As a plant derivative, coffee contains an abundance of bioactive compounds such as caffeine, polyphenols and other molecules some of which undergo changes during the procedure of roasting. Since it is so widely consumed, it has attracted scientific interest and several studies have been conducted in order to investigate its properties in various pathological conditions. Encouraging results have been found, but due to the fact that there is no information concerning its molecular mechanism of action, targeted studies are difficult to be conducted. Therefore, in this study, nine coffee samples were examined, three of which are derived from green coffee beans and the remaining six from roasted beans. Initially, extracts were prepared for each sample and then non-cytotoxic concentrations were administered in a myoblast cell line in order to determine their effect on oxidative stress markers (lipid peroxidation and protein carbonylation). According to the results, coffee extracts resulted in lower levels of cellular macromolecule oxidation in most cases. No statistically significant correlation was observed between the utilized assays, while roasting and decaffeination did not significantly affect coffee extracts potency. More specifically, in the protein carbonyls assay, administration of the roasted *Robusta* extract exhibited lower oxidation levels by 51,5% while in the TBARS assay, the more roasted Brazil extract (Roasted 7 min) had the most prominent effect, lowering lipid oxidation levels by 36,9%.

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο “ελεύθερες ρίζες” αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Cheeseman & Slater, 1993). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 2001; Prior & Cao, 1999)

Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύμικρός, καθώς κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Cheeseman & Slater, 1993).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.* 2004; Pani *et al.* 2010; AICR 2007).

1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου συνήθως περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ωστόσο, δεν αποτελούν όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη

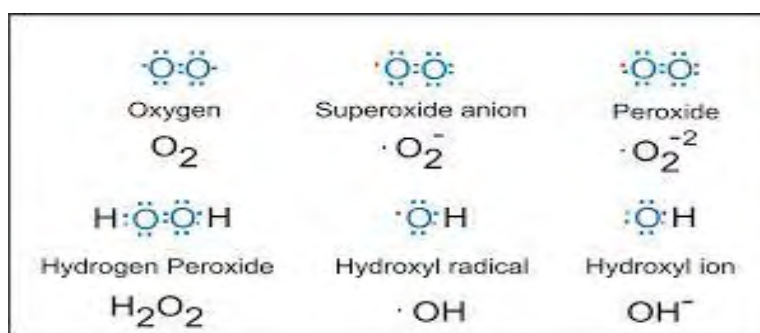
φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Παπαγαλάνης, 2014).

Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπών ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξειδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξειδωση και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (HO^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$).

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (HO^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο ($1O_2$)



Εικόνα 1: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO^{\cdot} και το διοξείδιο του

αζώτου NO₂• καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO₂ και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO⁻) (Fang, Yang, & Wu, 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

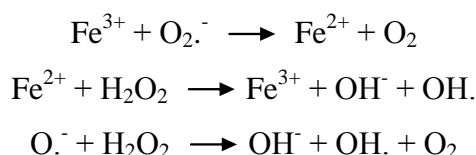
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO•)	Νιτρώδες Οξύ (HNO ₂)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO ₂ •)	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO ⁺)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO ⁻)

1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα. Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc₁ (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής O₂^{•-} και H₂O₂ (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Το H₂O₂ δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O₂^{•-} (Chance et al., 1979). Το O₂^{•-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O₂^{•-} και στο H₂O₂ δημιουργείται HO•.

Αντίδραση Haber-Weiss:



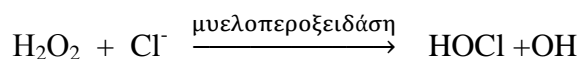
Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO⁻), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH). Από αυτό τελικά

σχηματίζονται οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ και NO_2^{\bullet} . Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH₂) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).

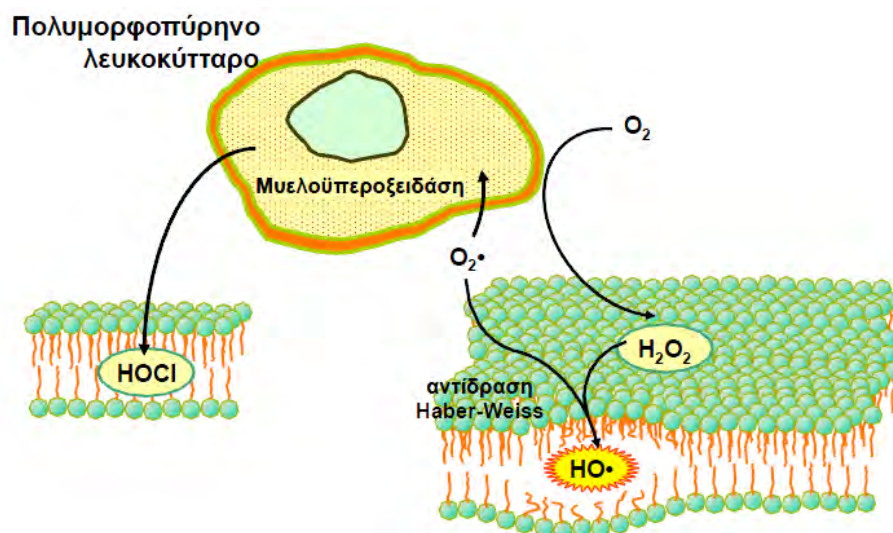
1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς.

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\bullet-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση. Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε HO^{\bullet} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$.



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει $HOCl$ όπως είδαμε.



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα

1.4.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuppusamy & Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $O_2^{\bullet -}$. Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

1.4.4 Κυτόχρωμα P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P450 (Yu, 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\bullet -}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\bullet -}$.

1.4.5 Αυτοοξειδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν. Ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο, σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).

1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες.

Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998; Ray et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed, Omaye, Klain, & Korte, 1992; Jones et al., 2000; Obata, Yamanaka, Kinemuchi, & Orelan, 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Lapidot, 2001; Lijinsky, 1999).

1.6 Βιολογική δράση των ROS

1.6.1 Θετικές επιδράσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ROS έχουν και ευεργετικές δράσεις οι οποίες εκδηλώνονται σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδο- όσο και διακυτταρικά. Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών. Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

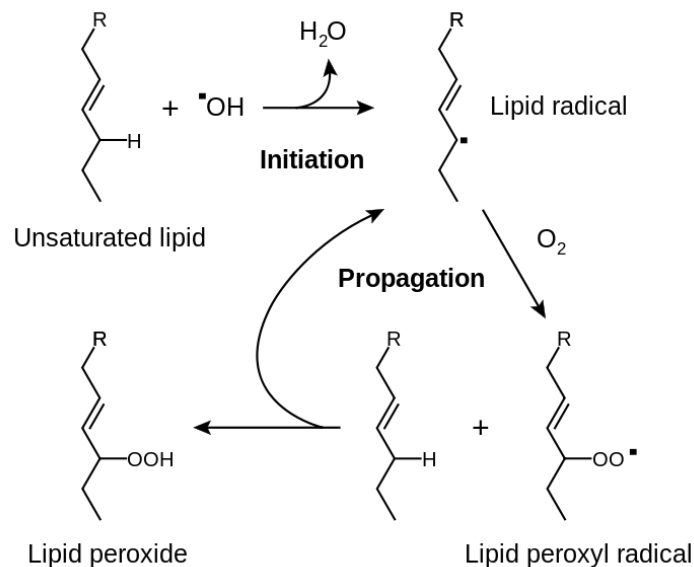
Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων

αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

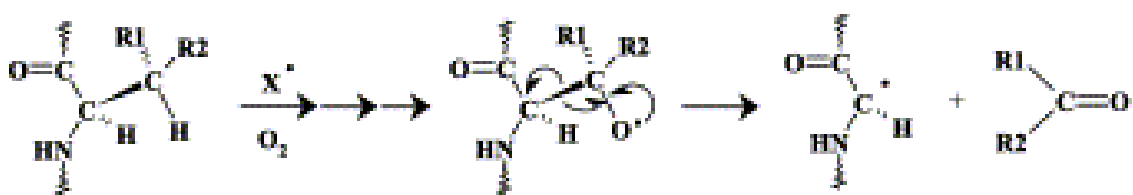
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Μέσω αυτής της αρνητικής δράσης τους έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

Λιπίδια: Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει $\text{ROO}\cdot$ κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο.



Εικόνα 3: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

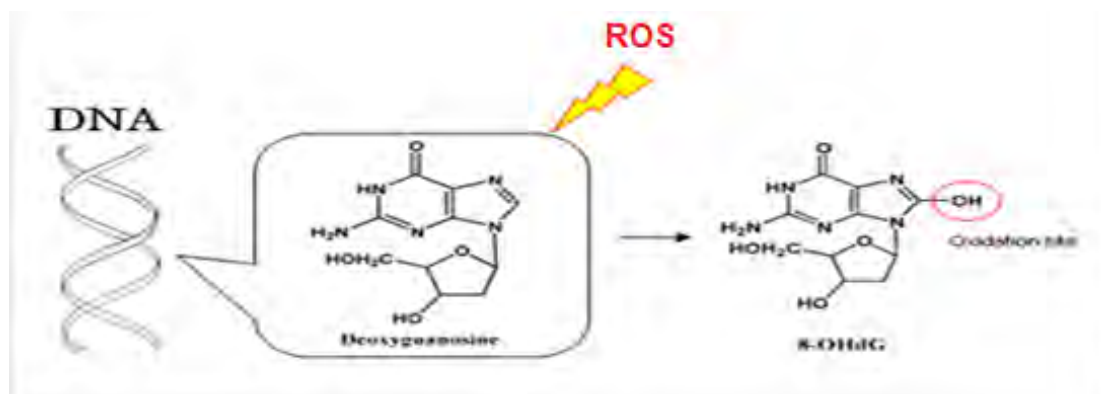
Πρωτεΐνες: Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $\text{HO}\cdot$, το $\text{RO}\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davies, 1987; Grune, Reinheckel, & Davies, 1997; Levine & Stadtman, 2001).



Εικόνα 4: Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης

DNA: Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-

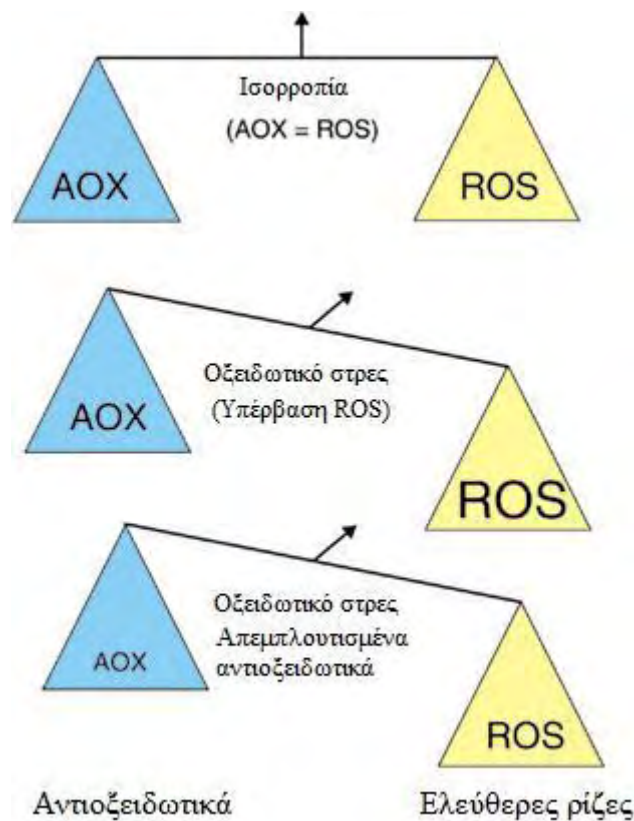
υδροξυαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Helbock, Beckman, & Ames, 1999).



Εικόνα 5: Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

1.7 Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης ROS και RNS. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της ποσότητας ROS, RNS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop, 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών αζώτου και οξυγόνου.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει:

Βλάβη στους ιστούς: Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του.

Κυτταρικό θάνατο: Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενο των κυττάρων περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, όπως CAT ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται

σε θάνατο από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο ‘‘μηχανισμός αυτοκτονίας’’ του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες.

1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό, ορίζεται η ουσία που βοηθάει στη μείωση της σοβαρότητας του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (Dekkers, van Doornen, & Kemper, 1996). Η αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky, 2002).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση:

- την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή)
- τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα)
- τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική)



Εικόνα 7: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας

1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

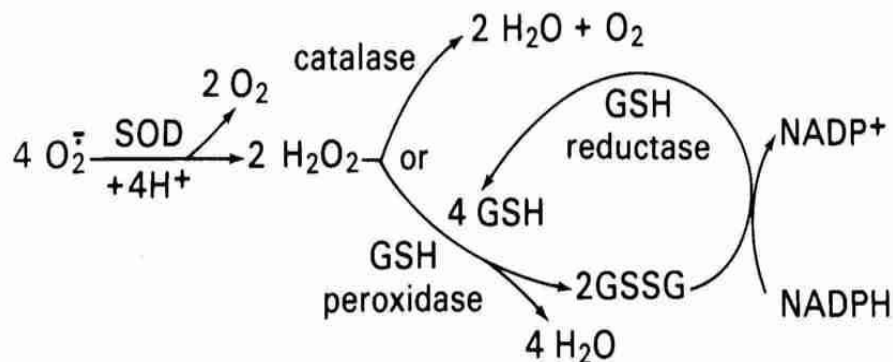
Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια

- Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

1.8.1.A Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν άμεση επίδραση. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko et al. 2006).



Εικόνα 8: Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

1.8.1.B Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Οι μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνουν τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τιςθειόλες (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες. Η βιταμίνη C και η βιταμίνη Ε είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki et al. 2003). Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς.

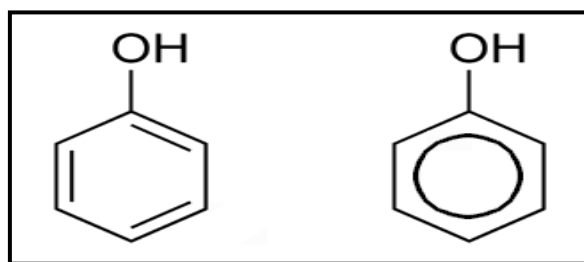
Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστο αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, αντιδρά απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10.

1.9 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011). Έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 9: Δομή φαινολών

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μίγματα πολυφαινολών, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκη είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesi, Vari, Sczzocchio, & Masella, 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

1.9.1 Φυσικές ιδιότητες

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως βρίσκονται σε υγρή ή σε στερεή μορφή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν. Επίσης, υπάρχουν και λιποδιαλυτές πολυφαινόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις

πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Papadopoulou & Frazier, 2004).

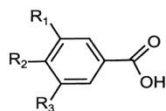
Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach et al. 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στου δακτυλίου τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach et al. 2004; Han et al. 2007). Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al. 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, τη βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007). Τα στυλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στυλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα

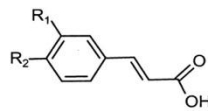
(Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά της νόσου του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων.

Hydroxybenzoic acids



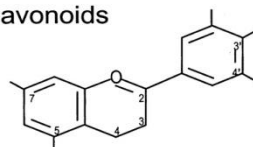
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

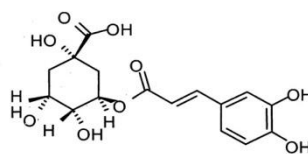


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoids

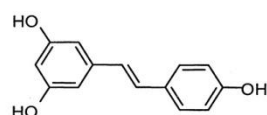


See Figure 2



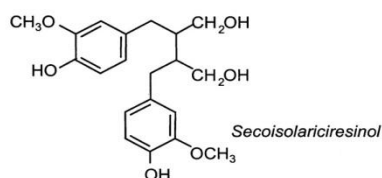
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

Lignans



Secoisolariciresinol

Εικόνα 10: Είδη πολυφαινολών

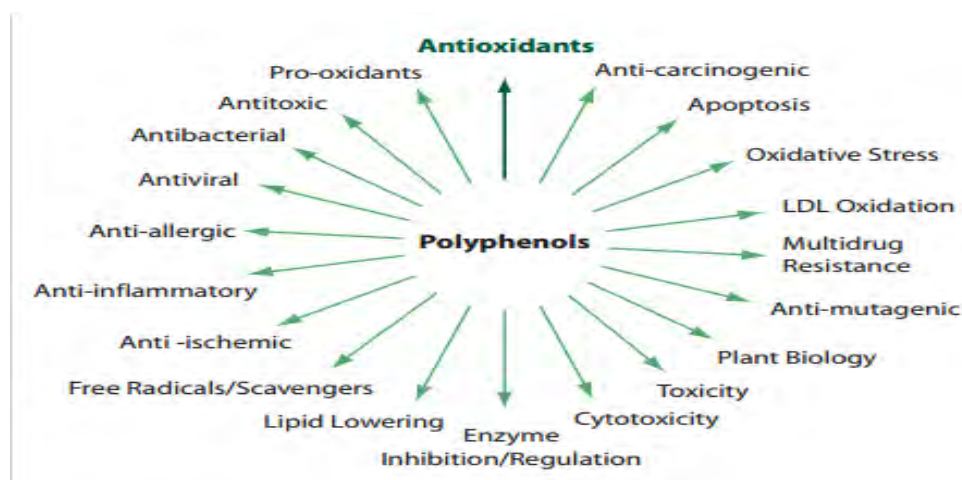
1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen et al. 2005).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, δρουν ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες

(λιγότερο δραστικές). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{+2} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές $\text{HO}\cdot$. Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert et al. 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo et al. 2014; Bouayed et al. 2011). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.



Εικόνα 11: Παράγοντες στους οποίους οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική δράση

1.10 Καφές

1.10.1 Γενικά

Ο καφές αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως. Παρασκευάζεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea*. Αρκετά είδη του γένους *Coffea* παράγουν τα μούρα από τα οποία προέρχονται οι κόκκοι του καφέ. Τα δύο κύρια είδη που καλλιεργούνται εμπορικά είναι ο *Coffea canephora* – γνωστότερο ως robusta - και *C. arabica*. Όλα τα φυτά καφέ προέρχονται από την τροπική Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και άλλα νησιά του Ινδικού ωκεανού. Ωστόσο, ο καφές μεταφέρθηκε και σε άλλα μέρη του κόσμου και πλέον καλλιεργείται σε περισσότερες από 70 χώρες. Ο καρπός του φυτού συλλέγεται όταν ωριμάσει, επεξεργάζεται και αποξηνέεται. Μετά την αποξήρανση οι κόκκοι καφέ συνήθως καβουρδίζονται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα αναλόγως με την επιθυμητή τελική γεύση (Maurin et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχει και η επιλογή μη καβουρδίσματος και τότε μιλάμε για τον πράσινο καφέ. Με την κατανάλωση ροφημάτων καφέ παρατηρείται μία διεγερτική δράση που οφείλεται στο μόριο της καφεΐνης.

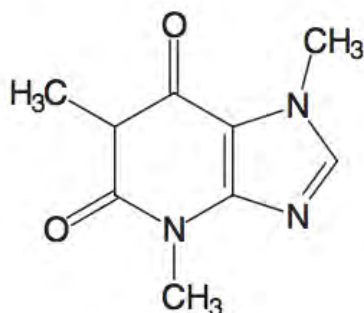
1.10.2 Χημική σύσταση

1.10.2.A Πράσινος καφές

Ο πράσινος καφές αποτελείται κυρίως από νερό, υδατάνθρακες και ίνες, πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα, οργανικά οξέα, χλωρογενικά οξέα, τριγονελλίνη και καφεΐνη. Από αυτά, τα χλωρογενικά οξέα, η τριγονελλίνη, η καφεΐνη, οι διαλυτές ίνες και τα διτερπένια των λιπιδίων είναι το πιο βιοενεργά και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να παίζουν σημαντικό στη διαμόρφωση της γεύσης του ροφήματος μετά το καβούρδισμα.

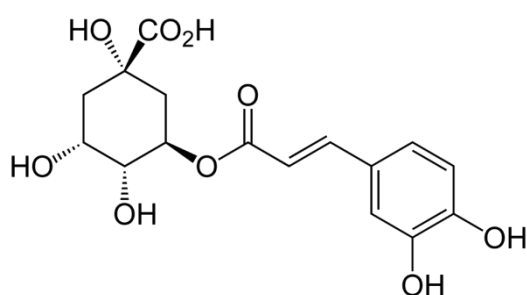
Καφεΐνη: είναι μία μέθυλξανθίνη με πικρή γεύση που, μολαταύτα, συμβάλλει κατά λιγότερο από 10% της πικράδας του ροφήματος καφέ. Αυτό το αλκαλοειδές είναι ανθεκτικό στη θερμότητα και η συγκέντρωση του στο *C. canephora* είναι περίπου διπλάσια από αυτή στο *C. arabica*. Η καφεΐνη διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα γιατί ανταγωνίζεται με την αδενοσίνη για πρόσδεση στους υποδοχείς της. Παρόλο που η πρόσληψη καφεΐνης έχει συσχετιστεί με υψηλή χοληστερόλη, στεφανιαίες νόσους και καρκίνο, άλλες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ευεργετικές επιδράσεις της στη υγεία όπως μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος (Adriana Farah, de Paulis, Moreira, Trugo, & Martin, 2006). Επιπρόσθετα, κάποιοι μεταβολίτες

της καφεΐνης (κυρίως 1-μεθυλξανθίνη και 1-μεθυλουρικό) έχουν παρουσιάσει αντιοξειδωτική ικανότητα in vitro (Lee, 2000).



Εικόνα 12: Δομή μορίου καφεΐνης

Χλωρογενικά οξέα: περιλαμβάνουν μία κύρια κατηγορία φαινολικών ενώσεων, οι οποίες προέρχονται κυρίως από εστεροποίηση trans-κινναμωμικών οξέων με κουνικό οξύ (Clifford, 2000). Τα χλωρογενικά οξέα συμβάλλουν στη γεύση των ροφημάτων καφέ προσδίδοντας στυφότητα, πικράδα και οξύτητα. Μολαταύτα, εάν είναι παρόντα σε υψηλές ποσότητες στο πράσινο καφέ, ενδέχεται να δημιουργήσει ανεπιθύμητη γεύση, πιθανόν λόγω του σχηματισμού προϊόντων οξείδωσης και αποικοδόμησης κατά το καβούρδισμα (A Farah, Monteiro, Calado, Franca, & Trugo, 2006). Η περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ στο φυτό *C. canephora* είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη από αυτή του *C. arabica*, αν και γενικά αυτή η συγκέντρωση ποικίλλει σημαντικά στα δύο είδη.



Εικόνα 13: Βασική δομή χλωρογενικών οξέων

1.10.2.B Καβουρδισμένος καφές

Η σύνθεση των κόκκων αλλάζει δραματικά κατά το καβούρδισμα, ως συνέπεια της πυρόλυσης, της καραμελοποίησης, και των αντιδράσεων Maillard. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του καβουρδισμένου καφέ (1,5% - 5%) είναι πολύ

χαμηλότερη από εκείνη του πράσινου καφέ, και ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό καβουρδίσματος (Trugo & Macrae, 1984).

Ως προϊόν των αντιδράσεων Maillard παράγονται οι μελανοΐδινες οι οποίες ορίζονται ως πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους και σκούρου χρώματος. Τα πολυμερή αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέ χρώμα του καβουρδισμένου καφέ και σχηματίζουν το 25% περίπου της ξηρής μάζας του (Nicoli, Anese, Manzocco, & Lerici, 1997). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μελανοΐδινες είναι εν μέρει αρμόδιες για τις αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες του καφέ και επομένως μπορούν να θεωρηθούν βιοδραστικές ενώσεις (Daglia, Papetti, Gregotti, Berte, & Gazzani, 2000; Nicoli et al., 1997).

Λόγω της θερμικής τους αστάθειας, τα χλωρογενικά οξέα υφίστανται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, όπως ισομερισμό, επιμερισμό, αποικοδόμηση σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και ενσωμάτωση σε μελανοΐδινες, συμβάλλοντας στο χρώμα και στη γεύση.

Η καφεΐνη δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, αλλά μπορεί να παρατηρηθούν μικρές απώλειες λόγω εξάχνωσης.

2. Σκοπός

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χορηγήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις καφέ σε κυτταρική σειρά μυοβλαστών με σκοπό την μελέτη της επίδρασης σε δείκτες λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξείδωσης. Εξετάστηκαν καφέδες και από τις δυο κύριες εμπορικές ποικιλίες (*Coffea arabica* και *Coffea robusta*) και πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ πράσινων και καβουρδισμένων κόκκων. Ακόμα εξετάστηκε η επίδραση της καφεΐνης και διαφορετικών βαθμών καβουρδίσματος στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από εννέα δείγματα καφέ: πέντε Brazil, δυο Robusta και δυο Decafeinated οι οποίοι ήταν χαρμάνι διαφόρων Arabica.

Τα πέντε Brazil είναι τα εξής:

Brazil Green (άψητος)

Brazil Roasted 7 min (7,15 min, 215°C)

Brazil Roasted 6 min (6,05 min, 215°C)

Brazil Roasted 5 min (5,32 min, 215°C)

Brazil Roasted 4 min (3,52 min, 215°C)

Τα δύο Robusta:

Robusta Green (άψητος)

Robusta Roasted (6 min, 218°C)

Και τα δυο Decafeinated:

Espresso Swiss Water Decaf Green (άψητος)

Espresso Swiss Water Decaf Roasted (6 min, 208°C)

Για την ετοιμασία των εκχυλισμάτων καφέ, από κάθε ποικιλία καφέ ζυγίζονται 2gr κόκκοι καφέ οι οποίοι με τη βοήθεια υγρού αζώτου σπάζονται σε γουδί έως ότου γίνουν σκόνη. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε falcon το οποίο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 20ml (10% w/v). Τα falcon τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, ώστε να προστατευθούν οι φωτοευαίσθητες πολυφαινόλες που υπάρχουν στον καφέ, και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο. Έπειτα, το κάθε falcon μαζί με πάγο τοποθετείται σε sonicator για 20 λεπτά (0,7s κύκλος, 75% amplitude). Μετά το πέρας 10 λεπτών, γίνεται παύση, ανάδευση και ακολουθούν τα άλλα 10 λεπτά. Το περιεχόμενο του falcon μεταφέρεται σε beaker και ακολουθεί ανάδευση υπό θέρμανση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε falcon καλυμμένο με αλουμινόχαρτο και αφού πέσει η θερμοκρασία του φυγοκεντρείται στα 3000 x g, στους 5°C για 10 λεπτά και έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρεται σε erpendorf και αυτά φυλάσσονται στους -80°C.

3.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς C2C12

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι μυοβλάστες ποντικού (C2C12). Καλλιεργήθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm², σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επώαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml τρυψίνης (0,25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.3 Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος

Τα κύτταρα λύνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ραδιοανοσοκαθίζησης [RadioImmunoPrecipitation Assay buffer, RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,25% SDS, 0, 25% δεοξυχολικό νάτριο, 1mM EDTA και 1% Triton-X), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (CompleteTM mini protease inhibitors, Roche), και επωάζονται για 30 min στον πάγο με ταυτόχρονη ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 20 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται, ακολουθεί προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

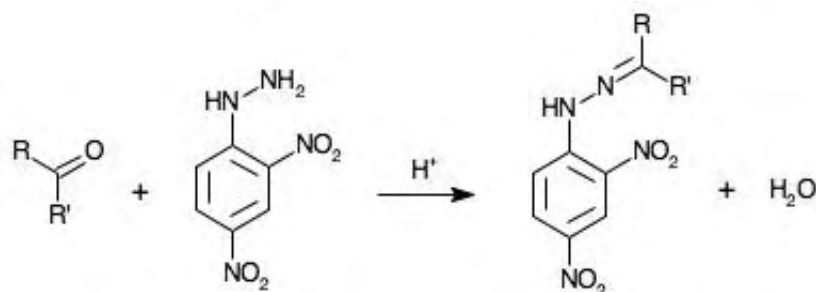
3.4 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976). Αρχικά, σε 5 μl πρωτεϊνικού κυτταρολύματος προστίθενται 15 μl dH₂O και 980 μl αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί απαλή ανακίνηση, επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου και φωτομέτρηση στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται 5 μ l RIPA buffer μαζί με 15 μ l dH₂O.

3.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB)

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός και αξιόπιστος δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως, διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).



Εικόνα 14: Σύνδεση πρωτεΐνης με το DNPH και σχηματισμός δινιτροφαινυλδραζονίου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των (Patsoukis et al., 2004). Πιο αναλυτικά, προστίθεται ίση ποσότητα 20% TCA (αναλογία 1:1) σε συγκεκριμένη ποσότητα σε μ l κυτταρικού αιωρήματος όπως προέκυψε από την μέθοδο Bradford ώστε να περιέχουν 30 μ g πρωτεΐνης (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 40°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μ l DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCl) για τα δείγματα ή 500 μ l 2,5N HCl για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 λεπτά και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης - οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο

βήμα επαναλαμβάνεται άλλες δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1 ml 5M ουρίας (pH 2,3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 3 min στους 4°C και μέτρηση απορρόφησης στα 375 nm.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DNPH. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0,022 \times Y] / C\delta,$$

όπου

Abs sample: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος,

Abs blank: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού,

$\epsilon_{375}\text{DNPH}$ (nmol/mL): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH,

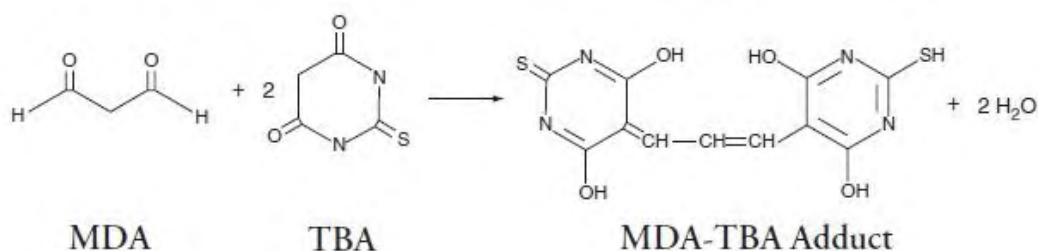
Τιμή Y: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ αντίδρασης}} / \mu\text{l αιωρήματος}$ [1000 μl / ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος]),

C δ : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η *μαλονδιαλδεϋδη* (MDA). Η μαλονδιαλδεϋδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεϋδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) με αναλογία μαλονδιαλδεϋδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεϋδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μία ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al. (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95°C.



Εικόνα 15: Αντίδραση MDA με TBA, που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου MDA-TBA

Συγκεκριμένη ποσότητα σε μl κυτταρικού αιωρήματος (όπως προέκυψε από την μέθοδο Bradford ώστε να περιέχουν 30 μg πρωτεΐνης) αναμειγνύεται με 500 μl διαλύματος 35% TCA και 500 μl διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml διαλύματος 2 M Na_2SO_4 και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C. Μετά την επώαση τα δείγματα κρυώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, 1 ml του κάθε δείγματος φυγοκεντρείται στα 15.000 g για 3 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με τοθειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Η μέτρηση απαιτεί >30 μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times Y / C_{\delta},$$

όπου

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος,

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού,

$\epsilon_{530\text{MDA}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονυλαλδεϋδης,

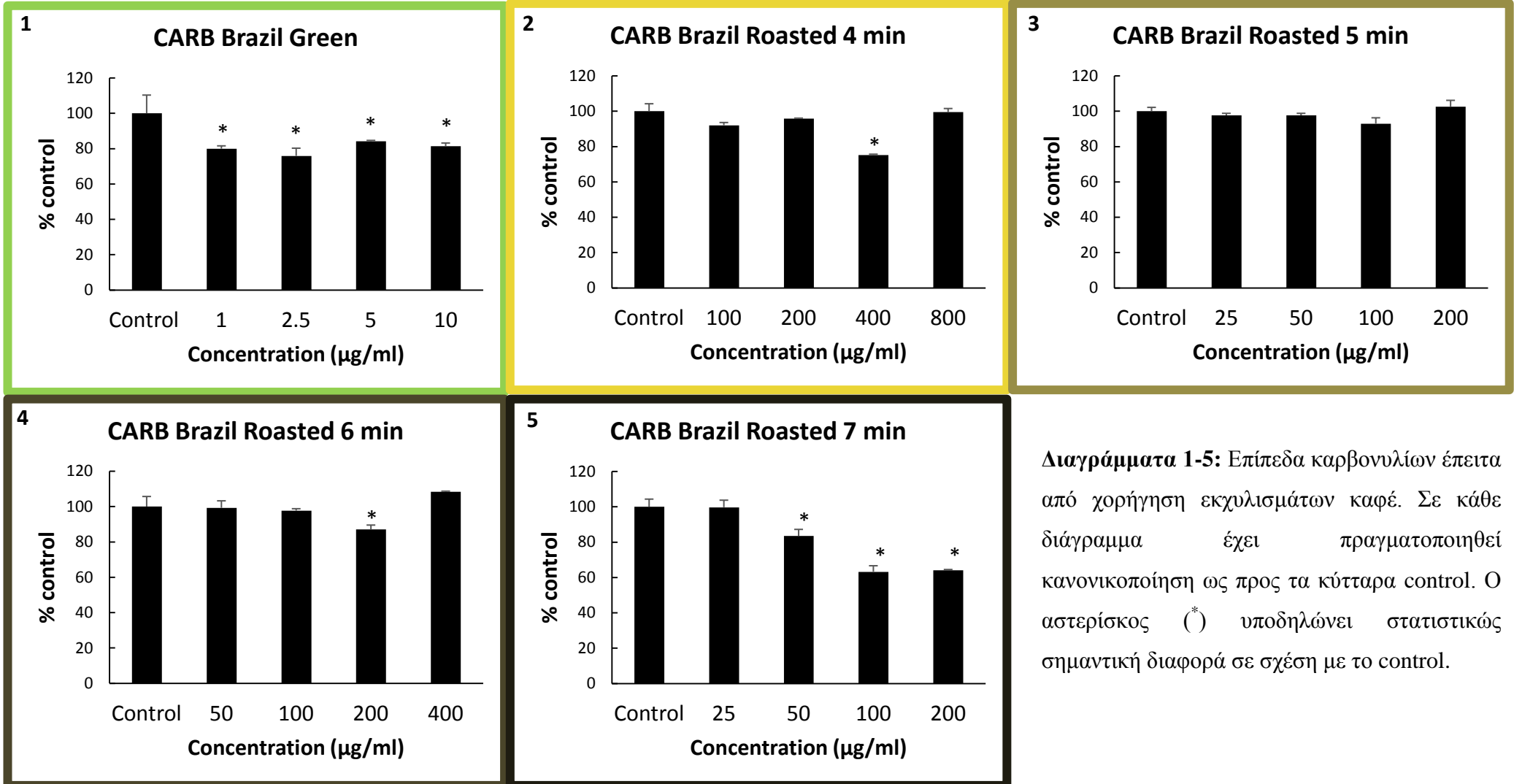
Τιμή Y: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ αντίδρασης}} / \mu\text{l αιωρήματος}$ [3000 μl / ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος])

Cδ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

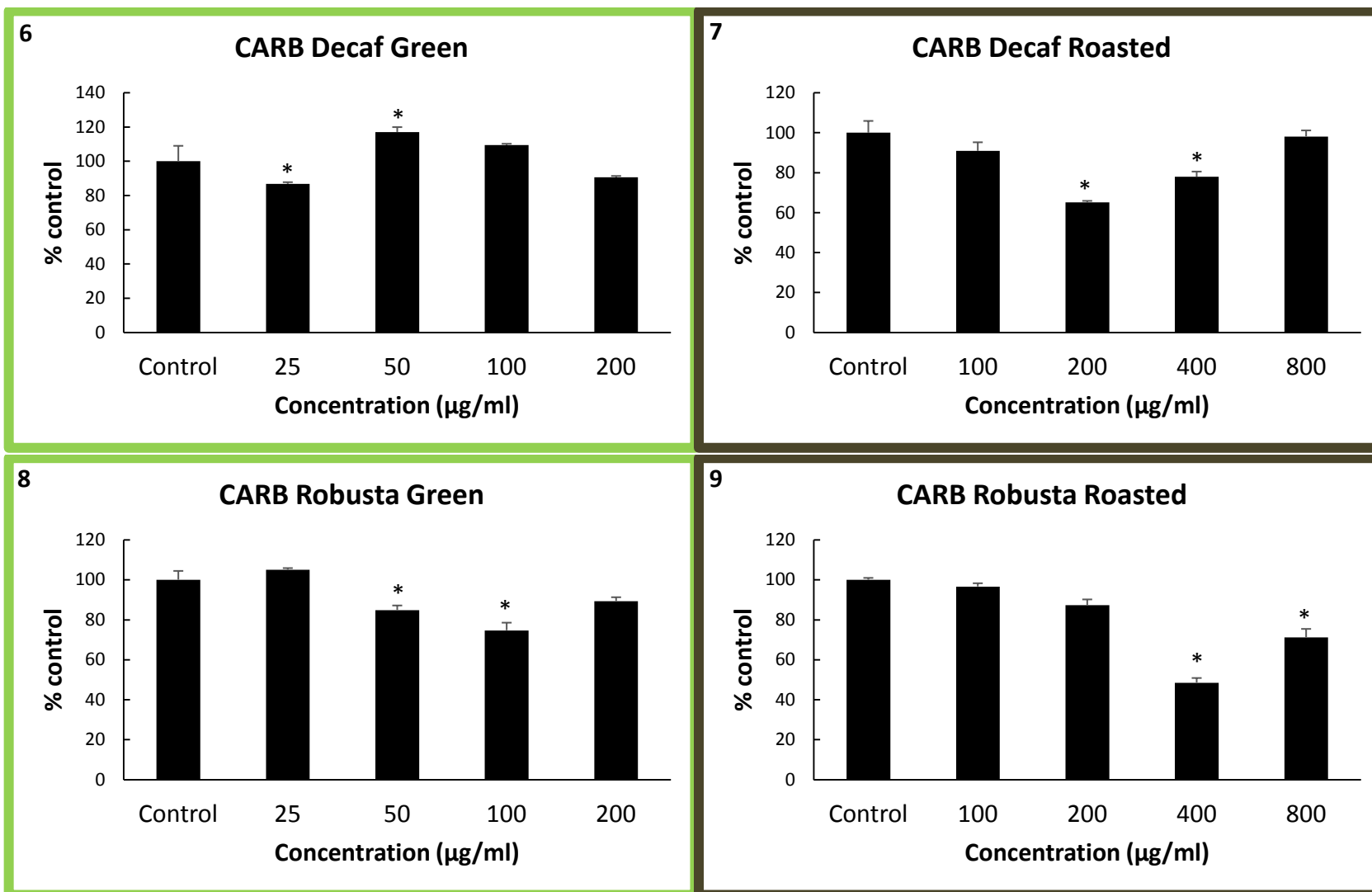
3.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος λογισμικού SPSS 20.0. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA με στάθμη σημαντικότητα $p < 0,05$ ενώ έγινε και συσχέτιση κατά Spearman μεταξύ των δυο μεθόδων (TBARS, CARB).

4. Αποτελέσματα



Διαγράμματα 1-5: Επίπεδα καρβονυλίων έπειτα από χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τα κύτταρα control. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.

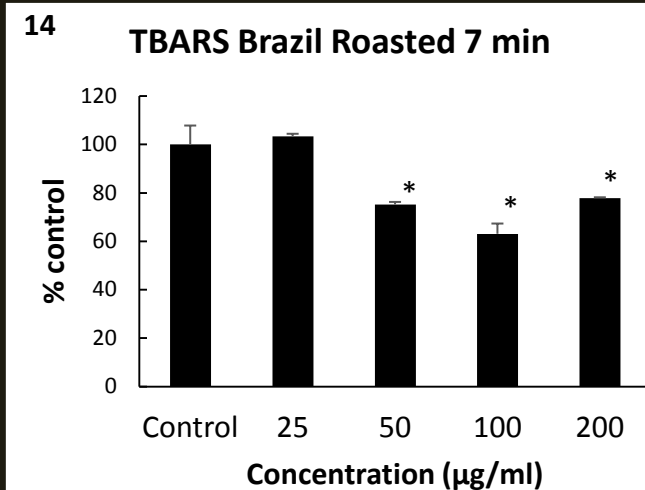
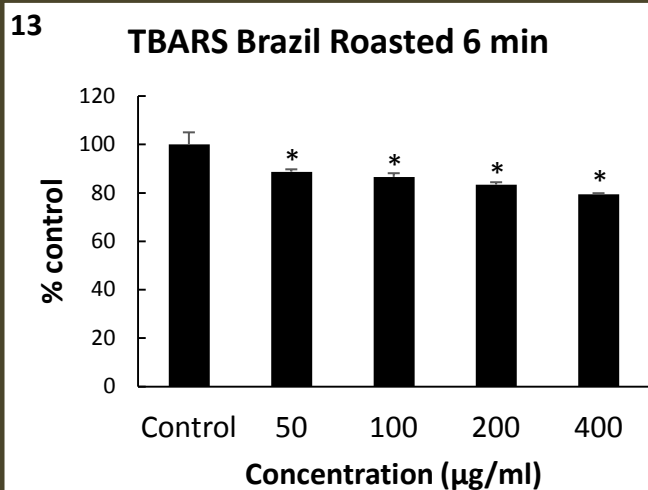
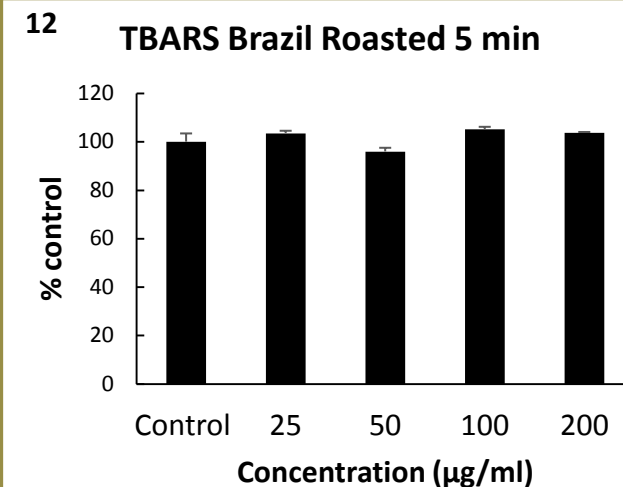
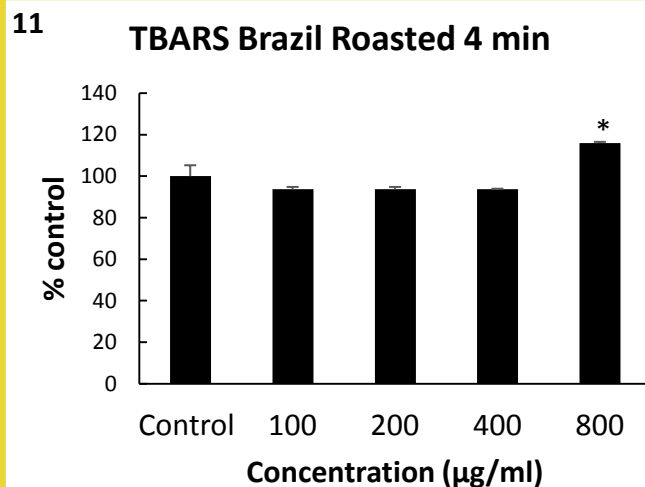
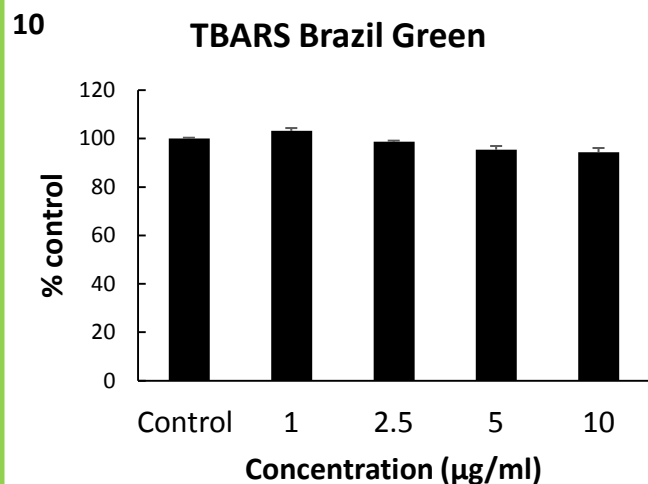


Διαγράμματα 6-9: Επίπεδα καρβονυλίων έπειτα από χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τα κύτταρα control. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.

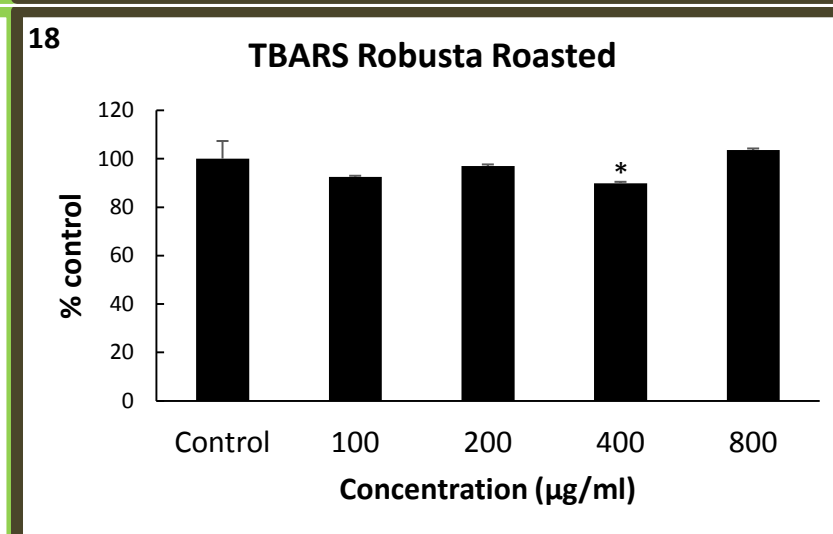
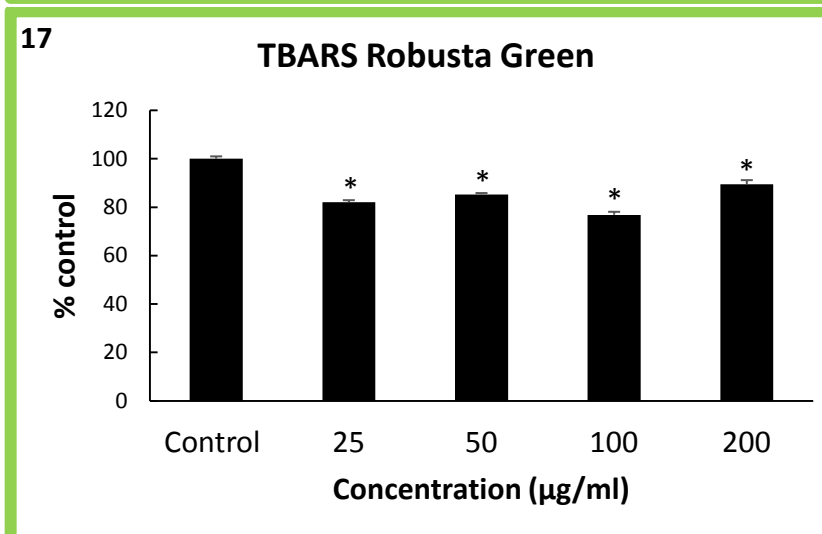
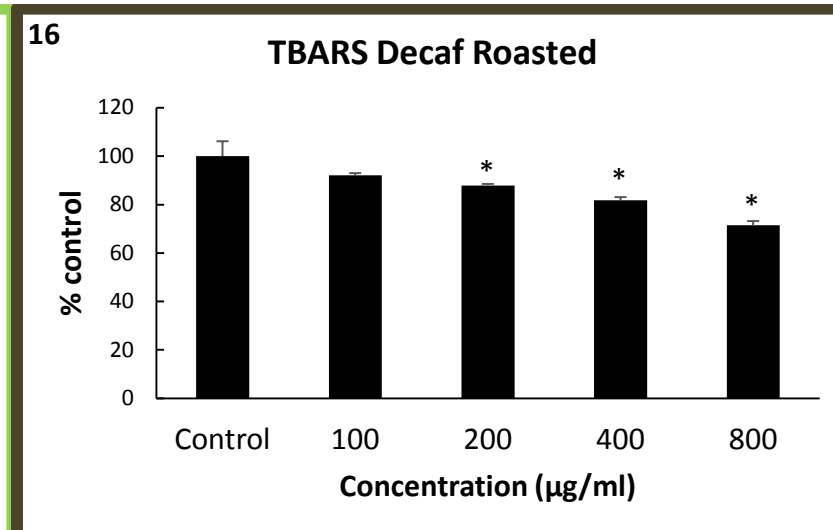
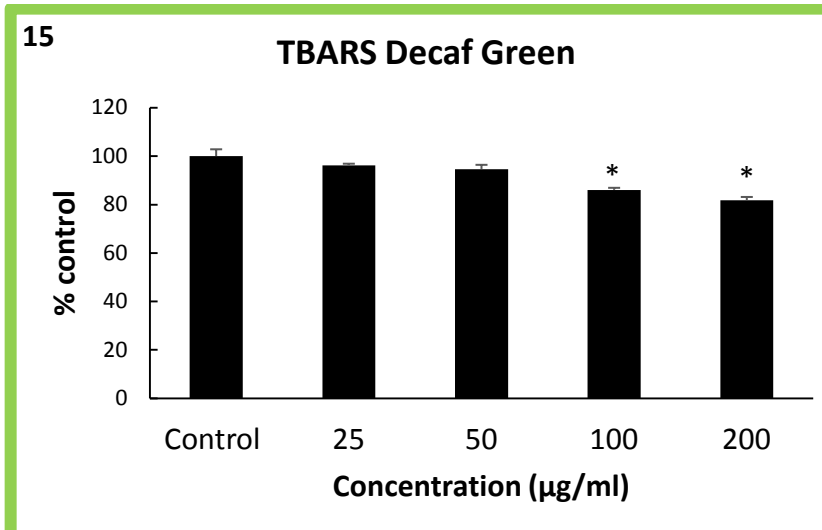
Με βάση τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα *Brazil Green* (διάγραμμα 1) προκάλεσε πτώση των επιπέδων των καρβονυλίων από 15,7% έως 24,1% σ' όλες τις συγκεντρώσεις. Στο εκχύλισμα *Brazil Roasted 4 min* (215°C, διάγραμμα 2) προκλήθηκε μείωση κατά 24,8% στα 400 µg/ml, ενώ στο *Brazil Roasted 5 min*, (215°C, διάγραμμα 3) δεν υπήρχε σημαντική διαφορά σε σχέση με το control. Στο *Brazil Roasted 6 min* (215°C, διάγραμμα 4) προκλήθηκε μείωση κατά 12,9% στα 200 µg/ml, ενώ στο *Brazil Roasted 7 min* (215°C, διάγραμμα 5) παρατηρήθηκε μείωση κατά 36,8%, 35,9% και 16,5% στα 100 µg/ml, 200 µg/ml και 50 µg/ml αντίστοιχα.

Στα Decaffeine εκχυλίσματα, στο *Espresso Swiss Water Decaf Green* (διάγραμμα 6) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των καρβονυλίων κατά 17% στα 50 µg/ml και στατιστικά σημαντική μείωση κατά 13,2% στα 25 µg/ml. Στο *Espresso Swiss Water Decaf Roasted* (6 min, 208°C, διάγραμμα 7) παρατηρήθηκε μείωση κατά 34,8% και 21,9% στα 200 µg/ml και 400 µg/ml αντίστοιχα.

Στο εκχύλισμα *Robusta Green* (διάγραμμα 8) είχαμε πτώση των καρβονυλίων κατά 15,1% και 25,2% στα 50 µg/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα. Στο εκχύλισμα *Robusta Roasted* (6 min, 218°C, διάγραμμα 9) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη πτώση κατά 51,5% στα 400 µg/ml, ενώ στατιστικά σημαντική ήταν και η μείωση κατά 28,7% στα 800 µg/ml.



Διαγράμματα 10-14: Επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης έπειτα από χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τα κύτταρα control. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.



Διαγράμματα 15-18: Επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης έπειτα από χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τα κύτταρα control. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.

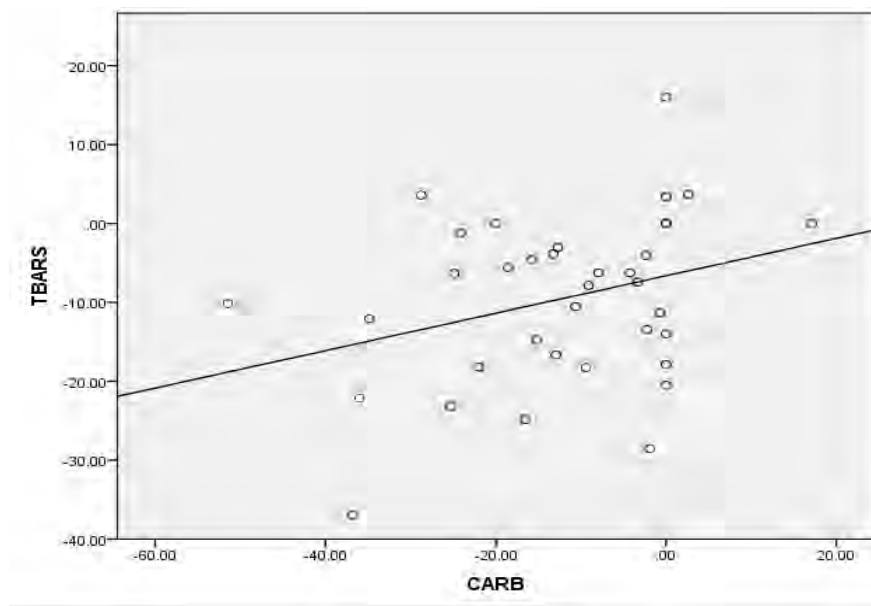
Με βάση τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα *Brazil Green* (διάγραμμα 10) και *Brazil Roasted 5 min* (215°C, διάγραμμα 12) δεν είχαν καμία επίδραση στα επίπεδα TBARS, ενώ το *Brazil Roasted 4 min* (215°C, διάγραμμα 11) εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS κατά 15,99% στα 800 µg/ml. Το εκχύλισμα *Brazil Roasted 6 min* (215°C, διάγραμμα 13) προκάλεσε, σ' όλες τις συγκεντρώσεις, δόσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων τους από 11,3% έως 20,5%. Στο *Brazil Roasted 7 min* (215°C, διάγραμμα 14) παρατηρήθηκε μείωση κατά 22,1%, 24,8% και 36,9% στα 200 µg/ml, 50 µg/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα. Η μείωση των TBARS κατά 36,9%, που παρατηρήθηκε στα 100 µg/ml ήταν η μεγαλύτερη κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Όσον αφορά τα Decaffeine εκχυλίσματα, το *Espresso Swiss Water Decaf Green* (διάγραμμα 15) προκάλεσε μείωση των επιπέδων TBARS κατά 13,8% και 18,2% στα 100 µg/ml και 200 µg/ml αντίστοιχα. Στο *Espresso Swiss Water Decaf Roasted (6 min, 208°C, διάγραμμα 16)* παρατηρήθηκε πτώση κατά 12%, 18,1% και 28,5% στα 200 µg/ml, 400 µg/ml και 800 µg/ml αντίστοιχα.

Τέλος, στο εκχύλισμα *Robusta Green* (διάγραμμα 17) είχαμε μείωση των TBARS από 10,5% έως 23,1%, σ' όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ στο εκχύλισμα *Robusta Roasted (6 min, 218°C, διάγραμμα 18)* παρατηρήθηκε μείωση κατά 10,2% στα 400 µg/ml.

Η σύγκριση μεταξύ πράσινων και καβουρδισμένων εκχυλισμάτων δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα σε καμία από τις δυο μεθόδους.

Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των δυο μεθόδων έδειξε πως **δεν** υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους ($R: 0,315, p=0,112$).



5. Συζήτηση

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η δραστικότητα του καφέ. Ο καφές είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του. Ως φυτικά προϊόντα, οι κόκκοι καφέ είναι πλούσιοι σε βιοδραστικά συστατικά, μεταξύ των οποίων η καφεΐνη, κάποια διτερπένια και πολυφαινολικά μόρια με κυριότερα τα χλωρογενικά οξέα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του καφέ είναι η επεξεργασία που υφίστανται οι κόκκοι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του ροφήματος. Αναλυτικότερα, οι κόκκοι καβουρδίζονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, που υπερβαίνουν τους 200°C, και για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα αναλόγως του επιθυμητού τύπου ροφήματος. Με την ανάπτυξη τόσο υψηλών θερμοκρασιών πραγματοποιούνται διεργασίες εντός του κόκκου που αλλάζουν τη φυσικοχημική του σύσταση, με σημαντικότερες τις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης τύπου Maillard. Αυτές οι αντιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται μελανοΐδινες. Τα μόρια αυτά πιθανώς εμφανίζουν βιοδραστικότητα, προσδίδοντας στον καβουρδισμένο κόκκο διαφορετικές ιδιότητες από τον πράσινο.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για το ρόφημα του καφέ κι ενώ κάποιες έδειξαν ευεργετικά για την υγεία αποτελέσματα, σε άλλες αυτά δεν ήταν εμφανή (Frost-Meyer & Logomarsino, 2012; Natella, Nardini, Belevi, & Scaccini, 2007). Οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν είτε απευθείας χορήγηση του ροφήματος σε ανθρώπους είτε *in vitro* πειράματα που μελετούσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα για το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τόσο καβουρδισμένοι όσο και πράσινοι κόκκοι ως προς την επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών, με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του καφέ. Οι μυοβλάστες επιλέχθηκαν καθώς είναι γνωστό ότι κατά την άσκηση παρατηρείται μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους μύες καθιστώντας τους ευαίσθητους σε οξειδωτικές βλάβες.

Αρχικά, παρήχθησαν τα εκχυλίσματα καφέ. Συνολικά εξετάστηκαν εννέα δείγματα καφέ που προέρχονται από τα είδη Arabica και Robusta. Από αυτά τα δείγματα, τρία προέρχονταν από πράσινους κόκκους και τα υπόλοιπα έξι από καβουρδισμένους καθώς σε μια ποικιλία εξετάστηκαν τέσσερα διαφορετικά καβουρδίσματα. Παράλληλα, έγινε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς σε φλάσκες

και χορήγηση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων καφέ. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυτταρικού αιωρήματος με τουλάχιστον 30 μg πρωτεΐνης με σκοπό τη μέτρηση της επίδρασης που είχαν τα εκχυλίσματα καφέ στην λιπιδική υπεροξειδωση και πρωτεϊνική οξειδωση των κυττάρων.

Με βάση τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα Brazil Green εμφάνισε ειδικότητα καθώς μείωσε στατιστικώς σημαντικά μόνο την πρωτεϊνική οξειδωση σε όλες τις συγκεντρώσεις (από 15,7% έως 24,1%) χωρίς ωστόσο να επηρεάσει την λιπιδική υπεροξειδωση. Ο ελαφρά ψημένος Brazil (Roasted 4 min) μείωσε τα καρβονύλια στα 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κατά 24,8% ενώ οδήγησε σε αύξηση των TBARS στα 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κατά 15,9%. Ο Brazil Roasted 5 min δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε καμία από τις δυο μεθόδους ενώ ο Brazil Roasted 6 min οδήγησε σε μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης κατά 12,9% στα 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και μείωσε τα TBARS σε όλες τις συγκεντρώσεις δοσο-εξαρτώμενα, από 11,3% έως και 20,5%. Όσον αφορά το περισσότερο καβουρδισμένο δείγμα Brazil (Roasted 7 min), προκάλεσε μείωση τόσο των καρβονυλίων (16,5% - 36,8%) όσο και των TBARS (22,1%- 36,9%) στις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το καβούρδισμα, όπως αναφέρθηκε, αλλάζει τη σύσταση του καφέ καθώς δημιουργούνται νέα μεγαλομοριακά σύμπλοκα ενώ αποικοδομούνται άλλα όπως τα χλωρογενικά οξέα, χρονοεξαρτώμενα. Η μεγαλύτερη ικανότητα προστασίας από οξειδωτική βλάβη με το παρατεταμένο καβούρδισμα έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα στην ίδια κυτταρική σειρά, όπου το περισσότερο καβουρδισμένο εκχύλισμα οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση επιπέδων των ROS σε σχέση με τα λιγότερο καβουρδισμένα, ήτοι ύπαρξη λιγότερων οξειδωτικών μορίων ικανών για οξειδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τα Decaffeine εκχυλίσματα, το Green προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των καρβονυλίων στα 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κατά 13,2% και στατιστικά σημαντική αύξηση στα 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κατά 17%. Στα TBARS παρατηρήθηκε μείωση 13,8% και 18,2% στα 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα. Στο Roasted εκχύλισμα παρατηρήθηκε μείωση τόσο στα καρβονύλια κατά 34,8% και 21,9% στα 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα όσο και δοσο-εξαρτώμενα στα TBARS κατά 12%, 18,1% και 28,5% στα 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα. Έτσι φαίνεται πως στην decaffeine ποικιλία, το καβούρδισμα οδήγησε σε αυξημένη αντιοξειδωτική

ικανότητα του εκχυλίσματος καθώς μείωσε την οξείδωση σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το ακαβούρδιστο δείγμα.

Στα εκχυλίσματα Robusta, στο Green είχαμε πτώση των καρβονυλίων κατά 15,1% και 25,2% στα 50 µg/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα, ενώ είχαμε μείωση και των TBARS από 10,5% έως 23,1%, σ' όλες τις συγκεντρώσεις. Τέλος στο Roasted παρατηρήθηκε μεγάλη πτώση των καρβονυλίων κατά 51,5% και 28,7% στα 400 µg/ml, και 800 µg/ml αντίστοιχα, ενώ στα TBARS παρατηρήθηκε μείωση κατά 10,2% στα 400 µg/ml. Στην ποικιλία Robusta, το καβούρδισμα μείωσε την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, ωστόσο παρατηρήθηκε και μειωμένη ικανότητα προστασίας των λιπιδίων σε σχέση με τον πράσινο καφέ.

Τα παραπάνω δεδομένα, κάνουν εμφανή την πολυπλοκότητα των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων καθώς το καβούρδισμα (και ο βαθμός καβουρδίσματος) είχε διαφορετική επίδραση αναλόγως της ποικιλίας, δείχνοντας έτσι τη σημαντικότητα της διαφοράς στη σύσταση.

Σαν γενική εικόνα, τα εκχυλίσματα οδήγησαν σε βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των μυοβλαστών, μειώνοντας στις περισσότερες περιπτώσεις τα επίπεδα οξείδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Η παρούσα πτυχιακή έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά προγενέστερων εργασιών του εργαστηρίου που καταδεικνύουν την ικανότητα εκχυλισμάτων να προστατεύουν κυτταρικά μακρομόρια από οξειδωτικές βλάβες εμφανίζοντας έτσι χημειοπροστατευτική δραστηριότητα (N. Goutzourelas et al., 2015; Nikolaos Goutzourelas et al., 2015; Kerasioti et al., 2014, 2016; Spanou et al., 2008). Το σύνολο των ανωτέρω εργασιών δίνουν μια εικόνα για το πόσο σημαντικοί είναι οι διατροφικοί παράγοντες για τη βελτίωση της λειτουργίας του οργανισμού, ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα και ο μεταβολισμός του κάθε πιθανού βιολειτουργικού μορίου. Πιο συγκεκριμένα, στον καφέ οι κύριες βιολειτουργικές ενώσεις είναι τα χλωρογενικά οξέα (στα εκχυλίσματά που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία έφταναν και το 30% του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος). Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν βιοδιαθεσιμότητα που αγγίζει το 30% σύμφωνα με μελέτες (Del Rio, Stalmach, Calani, & Crozier, 2010; Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, 2008). Με βάση το συγκεκριμένο ποσοστό, φαίνεται και ότι οι συγκεντρώσεις καφέ που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είναι βιολογικά σημαντικές. Αναλυτικότερα, μια κούπα καφέ περιέχει περίπου 200 mg χλωρογενικών οξέων (με μοριακό βάρος 354 g/mol). Ένας μέσος άνθρωπος 70 kg

έχει περίπου 42 lt νερού στα οποία μπορούν να κατανεμηθούν τα χλωρογενικά οξέα και σύμφωνα με την εξίσωση $C = \frac{n}{V}$, μια υποθετική συγκέντρωση 4,45 nmol/ml χλωρογενικών επιτυγχάνεται έπειτα από κατανάλωση μιας κούπας καφέ (χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο μεταβολισμός των ενώσεων. Στην παρούσα εργασία μια συγκέντρωση καφέ 100 µg/ml με συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο 40 µg/mg (που είναι ο μέσος όρος πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, 30% των οποίων είναι CGAs) οδηγεί σε συγκέντρωση ~3,6 nmol/ml CGAs, που αντιστοιχεί περίπου σε μια κούπα καφέ. Έτσι βλέπουμε πως οι συγκεντρώσεις 100 έως 400 µg/ml που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είναι βιολογικά σημαντικές καθώς μπορούν να επιτευχθούν με μέτρια κατανάλωση καφέ, 1 έως 4 κούπες.

Η ικανότητα του καφέ να παρεμποδίζει τις βλάβες σε λιπίδια και πρωτεΐνες μπορεί να οφείλεται σε δυο παράγοντες. Είτε απευθείας ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (που είναι τα μόρια στα οποία οφείλονται οι οξειδωτικές βλάβες) από αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ (π.χ. πολυφαινόλες, όπως τα χλωρογενικά οξέα) είτε στην επαγωγή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων. Με βάση προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου και οι δυο μηχανισμοί είναι πιθανοί, αναλόγως της συγκέντρωσης καφέ που χρησιμοποιείται.

Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα των πολυφαινολών να εμφανίζουν απευθείας αντιοξειδωτική δράση μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Όταν όμως η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει μια ουδό, τότε τα συγκεκριμένα μόρια αρχίζουν να δρουν προ-οξειδωτικά με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 που οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να αναστέλλουν τις ελεύθερες ρίζες έχει αναφερθεί σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου που δημοσιεύτηκε ενώ η ενεργοποίηση γονιδίων στόχων αναφέρθηκε σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία που είναι σε διαδικασία δημοσίευσης (Priftis et al., 2015, Αγγέλη-Τερζίδου 2017). Τα γονίδια που ενεργοποιήθηκαν περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων αυτά που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης όντας υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και την ανακύκλωση της, όπως το κύριο ένζυμο βιοσύνθεσης του τριπεπτιδίου, λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL), την αναγωγή (GSR), την περοξειδάση 1 (GPx1) και την τρανσφεράση α2 (GSTa2) της γλουταθειόνης. Ακόμα, αυξήθηκε η έκφραση

της NAD(P)H αφυδρογονάσης κινονών 1 (NQO1), ένα ένζυμο που εξουδετερώνει κινόνες, προστατεύοντας έτσι από την οξειδωση μακρομορίων.

Κλείνοντας, η συγκεκριμένη πτυχιακή έρχεται να προσθέσει δεδομένα για τον μηχανισμό δράσης του καφέ, καθώς είναι εμφανής η ικανότητα να προστατεύσει κυτταρικά μακρομόρια, καθιστώντας το συγκεκριμένο ρόφημα ως εν δυνάμει αντιοξειδωτικό και βιολειτουργικό. Ωστόσο, κρίνονται απαραίτητες περαιτέρω μελέτες σε άλλες κυτταρικές σειρές για να φανεί αν αυτή η δραστητικότητα είναι γενική ή ιστο-ειδική. Ακόμα η πραγματοποίηση *in vivo* πειραμάτων θα δώσει στοιχεία και για την βιοδιαθεσιμότητα και τον μεταβολισμό των ενώσεων του καφέ ώστε να μπορούν να αποσαφηνιστούν οι πιθανές ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία.

6. Βιβλιογραφία

- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5–6), 483–525. <http://doi.org/10.1080/10408360701612942>
- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033–1043. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T)
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <http://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F., & Gazzani, G. (2000). In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1449–1454.
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895–9901.
- Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 21(3), 213–238.
- Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*, 2(8), 820–833. <http://doi.org/10.3390/nu2080820>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115.
- Downey, J. M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annual Review of Physiology*, 52, 487–504. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.002415>
- Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J., & Korte, D. W. J. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), 153–165.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [http://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](http://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2006).

- Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 374–381. <http://doi.org/10.1021/jf0518305>
- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), 373–380. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, L. S. (2008). 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *Journal of Nutrition*, (September), 2309–2315. <http://doi.org/10.3945/jn.108.095554>.Federal
- Frost-Meyer, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 819–830. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.010>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Housmekeridou, A., Karapoulidou, C., Kerasioti, E., Aligiannis, N., ... Kouretas, D. (2015). Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(2), 433–441. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2246>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., ... Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4). <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), 526–534.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, 2, 950–988.
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <http://doi.org/10.1021/jf061478a>
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymology*, 300, 156–166.
- Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J., Lynn, M. J., & Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(4), 625–635.
- Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1388–1395.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.
- Kerasioti, E., Stagos, D., Georgatzi, V., Bregou, E., Priftis, A., Kafantaris, I., & Kouretas, D. (2016). Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 6585737. <http://doi.org/10.1155/2016/6585737>
- Kerasioti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., &

- Kouretas, D. (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry*, 155, 271–278. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalter, B., ... Owen, R. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer a valuable cancer chemopreventive effect. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), 67–75. <http://doi.org/10.1097/01.ccej.0000051106.40692.d3>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9880–9884.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 295(1–2), 141–154.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502.
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research*, 443(1–2), 129–138.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004b). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S.
- Maurin, O., Davis, A. P., Chester, M., Mvungi, E. F., Jauferally-Fakim, Y., & Fay, M. F. (2007). Towards a Phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Annals of Botany*, 100(7), 1565–1583. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm257>
- Mennen, L., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 326S–329S.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(9 Suppl), 30S–34S.
- Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., & Scaccini, C. (2007). Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 86(3), 604–609.
- Nicoli, M. C., Anese, M., Manzocco, L., & Lerici, C. R. (1997). Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 292–297. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0181>
- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., & Orelund, L. (2001). Release of dopamine

- by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Research*, 906(1–2), 170–175.
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Papadopoulou, A., & Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3–4), 186–190. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.017>
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(11–12), 1173–1181.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegur, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Ray, R. S., Mehrotra, S., Shankar, U., Babu, G. S., Joshi, P. C., & Hans, R. K. (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug and Chemical Toxicology*, 24(2), 191–200. <http://doi.org/10.1081/DCT-100102610>
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols and disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 304–317.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <http://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 5(3), 237–245.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113.
- Spanou, C., Bourou, G., Dervishi, A., Aligiannis, N., Angelis, A., Komiotis, D., ... Kouretas, D. (2008). Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6967–6976. <http://doi.org/10.1021/jf800842p>
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15(3), 219–227. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90006-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(84)90006-2)

- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Freeradicals, metalsandantioxidantsinoxidativestress-inducedcancer. *Chemico-Biologicalinteractions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162.
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.